

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 juil. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa  
N° 11354\*03

BRI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 6 N / 210502

REMISSION DES PIÈCES DATE <b>11 MARS 2003</b>		Réservé à l'INPI	
LIEU <b>75 INPI PARIS</b>		N° D'ENREGISTREMENT <b>0302972</b>	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>11 MARS 2003</b>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>IFB03 MKT CV2</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>12 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>		Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>		Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/> ou demande de certificat d'utilité initiale <input type="checkbox"/>	
Transformation d'une demande de brevet européen <b>Demande de brevet initiale</b> <input type="checkbox"/>		N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>	
N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>		N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>	
N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>		N° <input type="text"/> Date <input type="text"/>	
<b>13 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution			
<b>14 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>15 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		MAUNA KEA TECHNOLOGIES	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	9, rue d'Enghien	
	Code postal et ville	17 5010 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

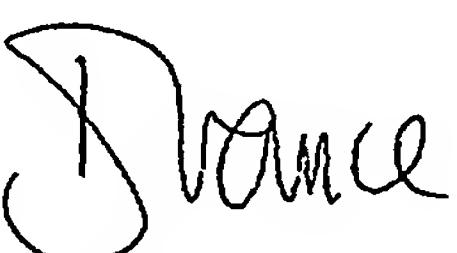
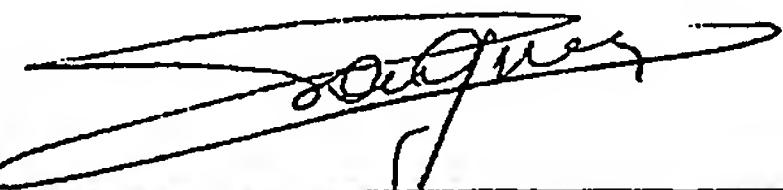
Remplir impérativement la 2<sup>me</sup> page

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉREQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES  
DATE 11 MARS 2003  
LIEU 75 INPI PARIS  
N° D'ENREGISTREMENT 0302972

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		PONTET ALLANO & ASSOCIES SELARL
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	25, rue Jean Rostand PARC CLUB ORSAY UNIVERSITE
	Code postal et ville	91181913 ORSAY CEDEX
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 69 33 21 21
N° de télécopie (facultatif)		01 69 41 95 88
Adresse électronique (facultatif)		
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
Isabelle de SAINT VIANCE CPI 94 10 01		 

« Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution»

La présente invention concerne un procédé et un appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution.

Les domaines d'applications de l'invention sont notamment l'analyse de 5 tissus biologiques in-vivo sur l'homme ou l'animal, externes par exemple dans le domaine de la dermatologie, ou internes et accessibles notamment par endoscopie, par exemple dans le domaine de la neurologie ou la gynécologie. La présente invention vise également l'analyse ex-vivo d'échantillons tissulaires provenant de prélèvements biopsiques, et l'analyse in-vitro de cultures en 10 biologie cellulaire.

Selon un second objet, la présente invention vise un procédé et un appareillage d'imagerie de fluorescence haute résolution adaptés à l'analyse in vivo, in situ, en temps réel, c'est à dire capables de fournir un nombre suffisant 15 d'images par seconde sans être tributaire des bougés du sujet et du praticien pour permettre notamment un examen assez rapide.

La fluorescence observée peut provenir d'un composé exogène (typiquement un marqueur injecté) ou endogène (présent naturellement dans la cellule ou transfected) d'un tissu biologique.

La présente invention concerne de manière plus particulière un 20 appareillage de fluorescence utilisant un transport à l'aide de fibres optiques souples des signaux d'excitation et des signaux de fluorescence émis, cela permettant notamment d'accéder au site à observer, de manière externe comme bras de commande articulé ou endoscopique notamment via le canal opérateur d'un endoscope, en déportant la source d'excitation.

25 Dans l'art antérieur, on connaît des appareillages d'imagerie de fluorescence destinés à l'observation en surface d'un site et comportant un guide d'image comprenant une fibre optique d'illumination du site. L'extrémité de la fibre optique est placée à une distance du site à observer et produit un faisceau d'excitation qui est divergent pour former une zone d'excitation à la surface du 30 tissu la plus grande possible. En variante, il est connu d'utiliser à la place de la fibre optique unique un faisceau constitué de plusieurs fibres optiques souples, voire plusieurs milliers de fibres optiques souples, qui sont excitées simultanément. La détection du signal de fluorescence s'effectue à l'aide d'une caméra vidéo CCD placée soit à l'extrémité proximale de la fibre optique (du côté

du manipulateur), soit au bout distal de la fibre optique (du côté du tissu observé). Cet appareillage procure une image vidéo à l'échelle macroscopique de la surface du tissu.

Plus récemment des appareillages d'imagerie confocale fibrée de 5 fluorescence ont été développés, destinés à l'observation d'un plan subsurfacique d'un site, mettant en œuvre un guide d'image constitué d'un faisceau de milliers de fibres optiques souples qui est muni à son extrémité d'un tête optique de focalisation, cette fois devant être placée au contact du site. Chaque fibre optique est utilisée tour à tour pour véhiculer à la fois le signal 10 d'excitation et en retour pour véhiculer le signal de fluorescence émis, de manière à former dans un plan subsurfacique un balayage point à point du site à observer. L'appareillage comporte en outre du côté proximal du guide d'image, une source d'excitation, des moyens de balayage des fibres tour à tour, des moyens de détection de chaque signal de fluorescence émis et des moyens de 15 traitement de signal pour reconstruire une image numérisée du site à partir de chaque élément d'image véhiculé par une fibre.

Le premier type d'appareillage possède une résolution latérale dite macroscopique car en général de l'ordre de 100 µm, permettant de ne visualiser que des éléments situés en surface, tandis que le second type d'appareillage dit 20 d'imagerie confocale possède une résolution latérale microscopique pouvant être de l'ordre de 2 µm permettant de visualiser des noyaux situés dans un plan à une profondeur comprise entre 20 et 100 µm. En outre, un appareillage d'imagerie confocale de ce type se caractérise avantageusement par une très bonne résolution axiale, de l'ordre de 10 µm, grâce à la focalisation du faisceau 25 d'excitation en sortie de chaque fibre qui permet de sélectionner un plan de coupe dans le tissu, grâce également à un filtrage spatial du signal de fluorescence émis à l'aide de la même fibre optique d'excitation et éventuellement grâce encore à un trou de filtrage placé devant le détecteur.

Ces deux types d'appareillage d'imagerie de fluorescence permettent donc 30 d'observer un tissu sous deux aspects différents soit en surface avec une résolution latérale macroscopique, soit dans un plan subsurfacique avec une très bonne résolution latérale à l'échelle microscopique conférée par le caractère confocal de l'appareillage.

La présente invention a pour premier objet de proposer un autre type de procédé et d'appareillage d'imagerie de fluorescence encore.

Elle propose un procédé d'imagerie de fluorescence haute résolution utilisant un guide d'image fait de plusieurs milliers de fibres optiques, un signal d'excitation étant émis par une source continue, dévié et injecté tour à tour dans l'une des fibres optiques dudit guide d'image et un signal de fluorescence émis en réaction étant collecté par la même fibre optique, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image. Le procédé selon l'invention se caractérise par le fait que l'extrémité des fibres est placée à nue directement en contact de la surface du tissu, chaque fibre étant adaptée à produire un faisceau divergent permettant d'exciter un micro-volume de tissu situé de la surface jusqu'à une profondeur maximale dépendante notamment du diamètre de cœur de ladite fibre optique.

A la différence de l'état de la technique, le procédé selon l'invention ne prévoit pas de balayer un signal qui est focalisé en sortie de chaque fibre mais de balayer un signal qui est divergent en sortie de chaque fibre. Cela va à l'encontre de ce qu'il était d'usage de faire pour obtenir une image de fluorescence de l'intérieur d'un tissu qui soit de la meilleure qualité possible, c'est à dire provenant d'un plan de coupe. Pourtant il s'avère que grâce au procédé de l'invention, la non focalisation du signal en sortie de fibres permet d'obtenir des images d'un volume situé juste sous la surface du tissu qui sont exploitables et intéressantes d'un point de vue médical. Ces images ne sont pas "confocales", car elles ne proviennent pas d'un plan de coupe subsurfacique balayé point à point, mais des images que l'on peut toutefois qualifier de "hautement résolues" car provenant du balayage tour à tour de microvolumes situés directement sous la surface et d'un filtrage spatial du signal de fluorescence émis par chaque microvolume par la même fibre que celle ayant servie à l'excitation.

Le principal avantage découlant de la présente invention, réside dans le fait que pour une application endoscopique, le diamètre de la sonde endoscopique peut être très petit dépendant uniquement du diamètre du guide d'image et donc de son nombre de fibres optiques. A titre d'exemple, pour un guide d'image de 6000 fibres présentent en général un diamètre de 330 µm alors que les sondes endoscopiques actuelles munies d'une tête optique ont un diamètre de quelques mm. On peut alors viser grâce à l'invention des domaines

d'applications, comme par exemple le domaine de la neurologie, où la taille de la sonde endoscopique est un facteur critique en s'affranchissant des problèmes inhérents à la miniaturisation de la tête optique de focalisation.

Selon l'invention, la taille des microvolumes excités et donc la profondeur 5 d'intégration du signal de fluorescence (profondeur maximale sous la surface), dépendent notamment du diamètre de cœur des fibres utilisées, de la distance inter-cœur, et de leur ouverture numérique (ON) que l'on préférera la plus grande possible pour collecter le maximum de photons. De préférence, on choisit un diamètre de cœur compris entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  correspondant en général à une 10 distance inter-cœur comprise entre 2 et 8  $\mu\text{m}$ , permettant une profondeur d'intégration comprise entre 5 et 25  $\mu\text{m}$ . Un traitement de signal réalisé sur le signal de fluorescence obtenu pour chaque microvolume permet de reconstruire une image dont la résolution axiale varie de 5  $\mu\text{m}$  à 25  $\mu\text{m}$  et la résolution latérale de 2 à 8  $\mu\text{m}$ . Cela permet de visualiser des noyaux situés dans les deux à trois 15 premières couches cellulaires. Le traitement du signal de fluorescence pour reconstruire l'image peut être réalisé de la même manière que celui réalisé à partir d'un signal provenant d'un plan confocal comme expliqué dans la description détaillée donnée ci-après.

La présente invention propose également un appareillage pour la mise en 20 œuvre du procédé mentionné ci-dessus.

Elle propose un appareillage d'imagerie de fluorescence haute résolution comprenant :

- un guide d'image constitué de milliers de fibres optiques ;
- une source émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'au moins un 25 fluorophore ciblé,
- des moyens de balayage et d'injection fibre après fibre du faisceau d'excitation produit par la source dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image ;
- des moyens de séparation de la longueur d'onde d'excitation et des longueurs 30 d'onde de fluorescence ;
- des moyens de détection du signal de fluorescence ; et
- des moyens de traitement du signal détecté permettant la reconstruction d'une image ;

caractérisé en ce que :

l'extrémité de chaque fibre est adaptée à produire un faisceau d'excitation qui est divergent et est destinée à être placée directement à nue au contact de la surface du tissu à observer.

5 Selon le second objet de l'invention, le procédé et l'appareillage décrits ci-dessus sont plus spécialement adaptés à l'imagerie in situ in vivo en temps réel.

Un tel procédé est caractérisé en ce que l'on dévie le signal d'excitation à une vitesse correspondant à l'acquisition d'un nombre d'images par seconde suffisant pour une utilisation en temps réel et en ce que l'on détecte le signal de 10 fluorescence à une fréquence de détection correspondant à une fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.

Le respect de l'échantillonnage des fibres (selon le critère de Shannon) permet d'obtenir une image point à point correspondant bien à chaque fibre. Cela permet de ne pas perdre d'information en échantillonnant l'ensemble des fibres 15 une à une tout en respectant un nombre moyen minimal d'images par seconde, à savoir en pratique au minimum 12 images par secondes pour un mode maximal de 640 x 640 pixels. Le choix de la fréquence de détection (bande passante du détecteur) en fonction de cet échantillonnage minimal permet ensuite pour chaque fibre de détecter le plus grand nombre possible de photons de 20 fluorescence.

Ainsi, selon un mode de réalisation possible, mettant en œuvre un guide d'image d'environ 30 000 fibres optiques souples, la fréquence d'échantillonnage et la bande passante du système de détection (une photodiode à avalanche ou équivalent) sont fixés sensiblement à 1,5 MHz, correspondant environ à 12 pixels 25 par fibre, permettant alors d'obtenir au minimum les 12 images/s en mode maximal 640 x 640 pixels.

En pratique, selon un mode de réalisation avantageux, permettant un balayage rapide approprié des fibres pour obtenir une image en temps réel, la déviation du faisceau est réglée en déterminant une fréquence de résonance 30 rapide d'un miroir résonnant « ligne » et une fréquence de résonance lente d'un miroir galvanométrique « trame ».

Selon l'invention, la durée de détection d'un flux en provenance d'une fibre est limitée dans le temps et très courte pour respecter l'acquisition d'une image en temps réel. Selon l'invention, on a donc en outre prévu des moyens

d'optimisation pour collecter et détecter le maximum de flux en provenance de l'échantillon pendant cette durée de détection limitée, notamment :

- on utilise des moyens optiques de déviation, d'injection, de focalisation et de détection présentant un degré d'achromatique dépendant de l'écart en 5 longueur d'onde entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde maximale de fluorescence, ainsi que de la largeur spectrale du signal de fluorescence émis ; cela permet avantageusement d'optimiser le flux de fluorescence collecté sur toute la bande spectrale de fluorescence émise ; et
- on choisit un détecteur ayant une efficacité quantique aux longueurs 10 d'ondes de fluorescence à détecter d'au moins 50%.

Selon l'invention, le traitement d'image réalisé ensuite sur le flux détecté est également optimisé, pour obtenir une image de très bonne qualité à partir de ce flux limité de photons détectés. Cette optimisation est réalisée de la manière suivante.

15 Une série d'étapes est réalisée préalablement à l'acquisition d'images en temps réel :

- une étape de détection de l'emplacement de chaque fibre d'un ensemble choisi de fibres destinés à être utilisées (soit l'ensemble du guide d'image soit un sous-ensemble choisi) ; cette étape est à réaliser 20 au moins à chaque changement de guide d'image ;
- une étape de calibration du taux d'injection dans chaque fibre, c'est à dire de définition d'un taux d'injection propre à chaque fibre ; et
- une étape de détection de l'image de fond (sans échantillon).

En fonctionnement, l'optimisation du traitement d'image comprend 25 notamment les étapes consistant, après numérisation du signal détecté :

- à définir le flux réel collecté par chaque fibre c'est-à-dire ne provenant que de l'échantillon, après correction en fonction du taux d'injection propre de la fibre et de la soustraction de l'image du fond, de manière à obtenir un signal corrigé;
- puis à effectuer une reconstruction de l'image à partir de ce signal corrigé, avec pour but notamment de transformer une image présentant une mosaïque de fibres en une image sans fibres apparentes.

Selon l'invention, ces deux dernières étapes doivent être réalisables en temps réel. Pour ce qui est de la correction du signal, celle-ci peut se faire en temps réel grâce à un traitement adapté à la structure du signal observé et un algorithme optimisé. Pour ce qui est de la reconstruction de l'image, elle peut se faire grâce au choix d'un nombre d'opérations par pixel réalisables en temps réel permettant d'obtenir le résultat recherché en terme de qualité d'image. Un filtrage passe-bas Gaussien représente un bon compromis entre la complexité du traitement, la qualité du résultat et le temps de calcul.

Pour gagner du temps et augmenter la complexité du traitement correspondant à la reconstruction de l'image, on peut aussi augmenter la capacité de traitement du matériel, par exemple en utilisant une carte de traitement spécifique et/ou une architecture parallèle comme un multiprocesseur.

La présente invention sera mieux comprise et d'autres avantages apparaîtront à la lumière de la description qui va suivre d'exemples de réalisation, description faite en référence aux dessins sur lesquels :

- la figure 1 est une vue schématique d'un appareillage selon l'invention ; et
- la figure 2 est une vue de détail de l'extrémité d'une fibre optique dans un appareillage selon l'invention ; et

Selon l'exemple choisi et représenté sur les figures 1 et 2, l'appareillage comporte :

- une source lumineuse 1 ;
- des moyens 2 de mise en forme du faisceau d'excitation ;
- des moyens 3 de séparation de longueurs d'onde ;
- des moyens 4 de balayage ;
- des moyens 5 d'injection de faisceau ;
- un guide d'image 6 constitué de fibres optiques souples ;
- des moyens 8 de réjection du faisceau d'excitation ;
- des moyens 9 de focalisation du signal de fluorescence ;
- des moyens 10 de filtrage spatial du signal de fluorescence ;
- des moyens 11 de détection du signal de fluorescence ; et
- des moyens 12 de traitement électronique et informatique du signal de fluorescence détecté et de visualisation.

Ces différents éléments sont détaillés ci-après.

La source lumineuse 1 est un laser émettant à une longueur d'onde d'excitation permettant d'exciter une grande gamme de fluorophores, par exemple 488 nm. Pour optimiser l'injection dans l'une des fibres du guide d'image 6, le faisceau d'excitation est circulaire pour pouvoir injecter une fibre de section 5 égale à celle de la fibre. Pour optimiser le taux d'injection, le laser est de préférence monomode longitudinal pour présenter le meilleur front d'onde possible pour l'injection dans une fibre optique faiblement multimode. Le laser émet de manière continue et stable (bruit le plus faible possible, <1%). La puissance en sortie disponible est de l'ordre de 20mW. A titre d'exemples, on 10 peut utiliser un laser à puits quantiques (VCSEL), un laser solide pompé par diode, une diode laser ou encore un laser à gaz tel que l'Argon.

En sortie de la source 1, sont placés les moyens 2 de mise en forme du faisceau laser d'excitation. Ils sont constitués d'un système optique afocal de 15 grandissement différent de 1, composé de deux lentilles L1 et L2 qui permettent de modifier le diamètre du faisceau laser. Le grandissement est calculé de sorte que le diamètre du faisceau soit adapté aux moyens d'injection 5 dans une fibre.

Le faisceau laser d'excitation remis en forme est ensuite dirigé vers les moyens 3 prévus pour séparer les longueurs d'ondes d'excitation et de fluorescence. Il s'agit par exemple d'un filtre dichroïque ayant une efficacité de 20 transmission de 98 à 99 % de la longueur d'onde d'excitation et qui réfléchit donc sensiblement les autres longueurs d'onde. Le signal de fluorescence, empruntant au retour le même chemin optique que le signal d'excitation, sera ainsi envoyé pratiquement totalement vers la voie de détection (8-11). Les moyens de réjection 8 placés sur la voie de détection servent à éliminer totalement les 1 à 2 25 % de réflexions parasites à la longueur d'onde d'excitation 488 nm qui passent vers la voie de détection (par exemple un filtre de réjection à 488 nm ou un filtre passe bande ne permettant par exemple qu'une transmission entre 500 et 600 nm).

Les moyens de balayage 4 reprennent ensuite le faisceau d'excitation. 30 Selon l'exemple choisi et représenté sur la figure 1, ces moyens comprennent un miroir M1 résonant à 4 KHz servant à dévier le faisceau horizontalement et donc à réaliser les lignes de l'image, d'un miroir M2 galvanométrique à 15 Hz servant à dévier le faisceau verticalement et donc à réaliser la trame de l'image ; et de deux systèmes afocaux de grandissement unitaire, AF1 situé entre les deux

miroirs et AF2 situé après le miroir M2, ces systèmes afocaux étant utilisés pour conjuguer les plans de rotation des deux miroirs M1 et M2 avec le plan d'injection dans l'une des fibres. Selon le second objet de l'invention, la vitesse de balayage est fixée pour permettre une observation des tissus *in vivo in situ* en temps réel.

5 Pour cela, le balayage doit être suffisamment rapide pour qu'il y ait au moins 12 images / s affichées à l'écran pour un mode d'affichage de 640 x 640 pixels correspondant au mode le plus lent. Pour les modes d'affichage ayant moins de pixels, le nombre d'images acquises par seconde sera ainsi toujours supérieur à 12 images / s. En variante, les moyens de balayage peuvent comprendre 10 notamment un miroir rotatif, des composants intégrés de type MEMs (miroirs de balayage X et Y), ou un système acousto-optique.

Le faisceau d'excitation dévié en sortie des moyens de balayage est dirigé vers les moyens optiques 5 afin d'être injecté dans l'une des fibres du guide d'image 6. Ces moyens 5 sont constitués ici de deux ensembles optiques E1 et 15 E2. Le premier ensemble optique E1 permet de corriger en partie les aberrations optiques en bord de champ des moyens de balayage 4, l'injection étant ainsi optimisée sur l'ensemble du champ optique (au centre comme au bord). Le second ensemble optique E2 est destiné à réaliser l'injection proprement dite. Sa focale et son ouverture numérique ont été choisies pour optimiser le taux 20 d'injection dans les fibres optiques du guide 6. Selon un mode de réalisation permettant d'obtenir le critère d'achromatique, le premier ensemble E1 est constitué d'un doublet de lentilles, et le second ensemble E2 de deux doublets de lentilles suivi d'une lentille située près du guide d'image. En variante, cette 25 optique d'injection pourrait être constituée de tout autre type d'optiques standards, comme par exemple deux triplets, ou de lentilles à gradient d'indice ou bien d'un objectif de microscope (toutefois plus coûteux).

Le guide d'image 6 peut être composé sensiblement de 5 000 à 100 000 fibres optiques souples, selon le diamètre extérieur du guide que l'on souhaite, qui est lui même fonction de l'application visée (endoscopique, taille de champ recherché, etc.). Il peut s'agir par exemple de guides d'images commercialisés 30 par la société FUJIKURA. Le diamètre de cœur des fibres est de préférence compris entre 1 et 4  $\mu\text{m}$ . Cela conduit à une divergence de faisceau en sortie de la fibre présentant un angle d'environ 18° pour une ouverture numérique de 0,42 dans l'eau. Un diamètre de cœur de 1  $\mu\text{m}$  peut être obtenu grâce à un procédé

d'étirement de l'extrémité de l'ensemble du guide d'image. L'extrémité du guide 6 est polie et ne comporte pas de moyens optiques. Le polissage a pour but de conférer le même état de surface à la face du guide et donc aux fibres nues au contact du tissu pour, d'une part que le fond de l'image obtenu soit le plus 5 homogène possible et, d'autre part, pour supprimer les éventuels problèmes d'adhérence des fibres avec le tissu qui risquerait de l'abîmer. Le polissage peut être plan ou arrondi pour épouser la forme du tissu. L'ouverture numérique de chaque fibre optique est de préférence choisie la plus grande possible pour collecter le maximum de photons de fluorescence, c'est à dire par exemple de 10 0,42. La distance inter-cœur confère la résolution latérale de l'image obtenue (distance entre deux points de l'image). Plus cette distance sera petite, meilleure sera la résolution, en revanche cela se fera au détriment de la taille du champ à imager. Il convient donc de trouver un bon compromis entre le nombre de fibres 15 du guide et la distance inter-cœur entre les fibres pour obtenir une bonne résolution latérale (entre 2 et 8  $\mu\text{m}$ ) avec une taille de champ appropriée pour observer les éléments tissulaires souhaités.

Deux exemples de guides pouvant convenir selon l'invention sont donnés ci-après :

	Exemple 1	Exemple 2
Nombre de fibres	6 000	30 000
Diamètre de champ imagé	300 $\mu\text{m}$	650 $\mu\text{m}$
Diamètre extérieur du guide	330 $\mu\text{m}$	750 $\mu\text{m}$
Diamètre de cœur d'une fibre	3 $\mu\text{m}$	1,9 $\mu\text{m}$
Distance inter-cœur	4 $\mu\text{m}$	3,3 $\mu\text{m}$
Profondeur maximale d'intégration du signal depuis la surface (schématisé par le plan P sur la figure 1) ou résolution axiale	15-20 $\mu\text{m}$	10-15 $\mu\text{m}$
Résolution latérale	4 $\mu\text{m}$	3,3 $\mu\text{m}$

En fonctionnement, l'extrémité distale du guide d'image est mise au contact de l'échantillon 13, la face d'extrémité des fibres étant ainsi directement au contact de la surface du tissu. Ce dernier est un tissu biologique ou une culture cellulaire. L'expression de la fluorescence est réalisée soit par un 5 fluorophore que l'on injecte (fluorescence systémique), soit par un fluorophore fabriqué par la cellule elle même par modification d'un gène (fluorescence transgénique). Dans ces deux cas, le fluorophore présent dans le micro-volume excité selon l'invention re-émet des photons sur une bande spectrale plus ou moins grande pouvant aller d'une dizaine de nanomètres à plus d'une centaine 10 de nanomètres.

Sur la voie de détection, le signal de fluorescence, en sortie du filtre de réjection 8, est ensuite focalisé par les moyens 9, constitués par exemple d'une lentille de détection, dans un trou de filtrage des moyens 10 de filtrage spatial. La focale de la lentille de détection est calculée pour que le signal de fluorescence 15 provenant d'une fibre soit de la taille ou légèrement inférieure à celle du trou de filtrage. Ce dernier permet de conserver la lumière de fluorescence ne provenant que de la fibre illuminée par le faisceau incident. Il permet de rejeter la lumière qui aurait pu être couplée dans les fibres adjacentes à celle qui est illuminée. La taille du trou est calculée pour que l'image d'une fibre s'y inscrive parfaitement. 20 Par ailleurs, dans un souci d'optimiser la quantité de photons traversant le trou de filtrage, et donc le flux détecté, les moyens de balayage 4, les moyens d'injection 5 et les moyens de détection 8, 9 et 10 sont adaptés au fluorophore détecté : ces moyens sont choisis pour être suffisamment achromatiques pour collecter des photons sur la bande la plus large d'émission du fluorophore.

25 Les moyens de détection 11 ont une sensibilité maximale aux longueurs d'onde de fluorescence étudiées. On peut utiliser par exemple une photodiode à avalanches (APD) ou bien un photomultiplicateur. Par ailleurs, pour obtenir une image en temps réel, la bande passante est choisie de préférence pour optimiser le temps d'intégration du signal de fluorescence. Elle est de 1,5 MHz, ce qui 30 correspond à la fréquence d'échantillonnage minimale du guide d'image avec un temps d'intégration optimisé sur chaque pixel.

Les moyens électroniques et informatiques 12 de commande, d'analyse et de traitement numérique du signal détecté et de visualisation comprennent les cartes suivantes:

- une carte de synchronisation 20 qui a pour fonctions :

5        - de commander de manière synchronisée le balayage, c'est-à-dire le mouvement des miroirs ligne M1 et trame M2 ;  
          - de connaître à tout instant la position du spot laser ainsi balayé ; et  
          - de gérer toutes les autres cartes par l'intermédiaire d'un micro-contrôleur lui-même pouvant être piloté ;

10      - une carte détecteur 21 qui comprend un circuit analogique qui réalise notamment une adaptation d'impédance, un convertisseur analogique numérique puis un composant logique programmable (par exemple un circuit FPGA) qui met en forme le signal ;  
          - une carte d'acquisition numérique 22 qui permet de traiter un flot de données numériques à fréquence variable et de l'afficher sur un écran 23 ;

15      - une carte graphique 24.

En variante, on peut utiliser une seule carte regroupant les fonctionnalités de ces différentes cartes.

Le traitement d'image se fait de la manière suivante.

20      A la mise en place d'un guide d'image dans l'appareillage, une première opération est effectuée pour reconnaître le motif des fibres dans le guide d'image, et donc connaître l'emplacement réel de chaque fibre destinée à être utilisée.

Les opérations suivantes sont également réalisées préalablement à 25 l'utilisation de l'appareillage :

          - la détermination du taux d'injection propre à chaque fibre, à l'aide d'un échantillon homogène, ce taux d'injection pouvant varier d'une fibre à une autre ; et

          - la mesure de l'image de fond, effectuée sans échantillon.

30      Ces deux opérations peuvent être réalisées régulièrement en fonction de la fréquence d'utilisation de l'appareillage. Les résultats obtenus vont être utilisés pour corriger en fonctionnement le signal numérique en sortie de la carte détecteur.

En fonctionnement, selon l'invention 2 groupes de traitements sont effectués sur le signal numérique en sortie de la carte détecteur :

Le premier groupe consiste dans un premier temps à corriger le signal numérique notamment pour tenir compte du taux propre réel d'injection de la fibre dont est issu ledit signal et pour lui soustraire la partie du flux correspondant à l'image de fond. Cela permet de ne traiter qu'un signal correspondant réellement à l'échantillon observé. On utilise pour ce groupe de traitement un algorithme de calcul classique qui est optimisable pour respecter le cas échéant la contrainte du temps réel.

Le second groupe consiste ensuite, à partir du signal corrigé, à reconstruire l'image numérique qui sera visualisée par le praticien. Le but du traitement effectué est d'offrir à la visualisation une image numérique reconstituée qui ne soit pas simplement une mosaïque d'éléments d'image correspondant chacun à un signal numérique corrigé d'une fibre mis côte à côte, mais d'offrir une image numérique reconstituée qui ne fasse plus apparaître les fibres. On utilise pour cela un algorithme destiné à effectuer un certain nombre d'opérations sur chaque pixel, l'algorithme étant choisi pour respecter la contrainte de temps réel, c'est à dire qu'il doit représenter un bon compromis entre la complexité des opérations demandées, la qualité du résultat que l'on peut obtenir et le temps de calcul. A titre d'exemple, on peut utiliser un algorithme de filtrage passe-bas Gaussien.

Le fonctionnement de l'appareillage est le suivant. La source 1 produit un faisceau parallèle circulaire d'excitation à  $\lambda=488$  nm, qui est ensuite remis en forme dans le système afocal 2 afin de lui donner la taille adéquate pour la meilleure injection possible dans le cœur d'une fibre. Ce faisceau est ensuite envoyé vers le système de séparation dichroïque 3 qui réfléchit la longueur d'onde d'excitation. Le faisceau incident est ensuite dévié angulairement dans le temps dans les deux directions de l'espace par le système de balayage optomécanique de miroirs 4, et injecté grâce aux moyens optiques d'injection dans l'une des fibres du guide d'image 6. Les moyens électroniques 12 servent à commander l'injection à un instant donné de l'une des fibres optiques du guide d'image en déviant angulairement le faisceau au moyen des miroirs, et ce point par point pour une ligne donnée, et ligne après ligne, pour constituer l'image. En sortie du guide, la lumière divergente émergeant de la fibre injectée est diffusée

dans un microvolume de l'échantillon situé entre la surface et une profondeur maximale de 25 µm (selon le diamètre de cœur des fibres et leur ON). Grâce au balayage, l'échantillon est illuminé micro-volume par micro-volume. A chaque instant, le micro-volume excité dans le tissu émet alors un signal de fluorescence qui a la particularité d'être décalé vers des plus grandes longueurs d'onde. Ce signal de fluorescence est capté par la même fibre optique que celle ayant servie à l'excitation, puis suit le chemin inverse du faisceau d'excitation jusqu'au filtre dichroïque 3 qui va transmettre le signal de fluorescence vers la voie de détection. Les réflexions parasites se produisant à la longueur d'onde d'excitation vont ensuite être rejetées par le filtre de réjection 8. Enfin, le signal de fluorescence est focalisé dans le trou de filtrage 10 pour ne sélectionner que la lumière provenant de la fibre excitée et les photons sont détectés par la photodiode à avalanche 11. Le signal détecté est ensuite numérisé et corrigé. Les signaux détectés, les uns après les autres, sont traités en temps réel grâce au traitement d'image décrit plus haut pour permettre la reconstruction d'une image en temps réel visualisée à l'écran.

1. Procédé pour réaliser une image de fluorescence haute résolution à l'aide d'un guide d'image fait de plusieurs milliers de fibres optiques, un signal d'excitation étant émis par une source continue, dévié et injecté tour à tour dans l'une des fibres optiques dudit guide d'image et un signal de fluorescence émis en réaction étant collecté par la même fibre optique que celle utilisée pour l'excitation, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image, caractérisé en ce que l'extrémité des fibres est destinée à être placée à nue directement en contact de la surface du tissu à imager, chaque fibre étant adaptée à produire un faisceau divergent susceptible d'exciter un micro-volume du tissu situé de la surface jusqu'à une profondeur maximale dépendante notamment du diamètre de cœur des fibres optiques.  
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le guide d'image comporte de préférence sensiblement entre 5 000 et 100 000 fibres de  $\varnothing$  de cœur de préférence compris sensiblement entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  et de distance inter cœur de préférence comprise sensiblement entre 2 et 8  $\mu\text{m}$ .  
10
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'extrémité des fibres est polie.  
15
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 pour la réalisation d'une image *in vivo in situ*, caractérisé en ce que l'on dévie le signal d'excitation à une vitesse correspondant à l'acquisition d'un nombre d'images par seconde suffisant pour une utilisation en temps réel et en ce que l'on détecte le signal de fluorescence à une fréquence de détection correspondant à une fréquence 20 minimale d'échantillonnage des fibres une à une.  
25
5. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on règle une vitesse de déviation du faisceau d'excitation en déterminant une fréquence de résonance rapide d'un miroir résonnant ligne et une fréquence lente d'un miroir galvanométrique trame.  
30
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on utilise des moyens optiques de déviation, d'injection, de focalisation et de détection présentant un degré d'achromatique permettant de collecter des photons sur toute la largeur de la bande d'émission du fluorophore excité.

7.. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une efficacité quantique de la détection aux longueurs d'ondes de fluorescence à détecter d'au moins 50%.

8.. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une 5 étape préalable de détection de l'emplacement des fibres du guide d'image destinées à être utilisées.

9.. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détermination du taux réel d'injection propre à chaque fibre.

10.. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une 10 étape préalable de détermination du flux collecté correspondant à l'image de fond.

11.. Procédé selon les revendications 9 et 10, caractérisé par une étape de correction du signal numérisé en provenance d'une fibre par soustraction du flux correspondant à l'image de fond et adaptation au taux réel d'injection propre de 15 ladite fibre.

12.. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par une étape de reconstruction de l'image à partir du signal corrigé.

13.. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape de reconstruction d'image comprend un filtrage passe- bas Gaussien.

20 14.. Appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes, comprenant :

- le guide d'image (6) ;
- la source (1) émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'au moins 25 un fluorophore ciblé,
- des moyens de balayage (4) et d'injection (5) fibre après fibre du faisceau d'excitation produit par la source (1) dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image (6) ;
- des moyens (3) de séparation de la longueur d'onde d'excitation et des 30 longueurs d'onde de fluorescence ;
- des moyens de détection (11) du signal de fluorescence ; et
- des moyens (12) de traitement du signal détecté permettant la réalisation d'une image ;

caractérisé en ce que l'extrémité de chaque fibre est adaptée à produire un faisceau qui est divergent et est destinée à être placée à nue directement au contact de la surface du tissu à observer.

15. 15. Appareillage selon la revendication 14, caractérisé en ce que le guide d'image comporte de préférence sensiblement entre 5 000 et 100 000 fibres de Ø de cœur de préférence compris sensiblement entre 1 et 4  $\mu\text{m}$  et de distance inter cœur de préférence comprise entre 2 et 8  $\mu\text{m}$ .
16. 16. Appareillage selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que l'extrémité des fibres est polie.
- 10 17. 17. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que les moyens de balayage sont adaptés à déplacer le faisceau d'excitation à une vitesse correspondant à l'obtention d'une image en temps réel et les moyens de détection présentent une bande passante dont la fréquence est fixée en fonction de la fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.
- 15 18. 18. Appareillage selon la revendication 17, caractérisé en ce que le faisceau d'excitation produit par la source (1) est monomode longitudinal présentant une qualité de front d'onde optimale pour l'injection dans une fibre optique faiblement multimode.
- 20 19. 19. Appareillage selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que la section d'une fibre étant circulaire, le faisceau d'excitation produit par la source est circulaire de manière à optimiser l'injection dans une fibre.
- 25 20. 20. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 19, caractérisé par des moyens (2) de mise en forme du faisceau utilisés en sortie de la source (1) pour mettre en forme le faisceau d'excitation afin de l'adapter aux moyens d'injection (5) dans le guide d'image (6).
21. 21. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que les moyens pour séparer les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence comprennent un filtre dichroïque (3) ayant un maximum d'efficacité à la longueur d'onde d'excitation.
- 30 22. 22. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 21, caractérisé par des moyens de réjection (8) placé en amont des moyens de détection (11) et adaptés à éliminer la longueur d'onde d'excitation.

23. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 22, caractérisé en ce que les moyens de balayage (4) comprennent un miroir ligne résonnant (M1), un miroir galvanométrique trame (M2), un premier système optique afocal de grossissement unitaire (AF1) permettant de conjuguer les deux miroirs et un 5 second système afocal (AF2) de grossissement unitaire permettant de conjuguer le plan de rotation du second miroir avec le plan d'injection dans l'une des fibres.

24. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 23, caractérisé en ce que les moyens d'injection (5) comprennent deux ensembles optiques (E1,E2), le premier ensemble (E1) étant adapté à corriger les aberrations optiques en 10 bordure de champ des moyens de balayage (4) et le second ensemble (E2) étant adapté à réaliser l'injection proprement dite dans l'une des fibres du guide d'image (6).

25. Appareillage selon la revendication 24, caractérisé en ce que le premier ensemble optique (E1) comprend un doublet et le second ensemble optique (E2) 15 comprend deux doublets suivis d'une lentille.

26. Appareillage selon l'une des revendications 14 à 25, caractérisé par un trou de filtrage (10) placé avant les moyens de détection (11) dont le diamètre est choisi pour que l'image d'une fibre s'y inscrive.

27. Appareillage selon la revendication 26, caractérisé par des moyens de 20 focalisation (9) du signal de fluorescence sur le trou de filtrage (10).

FIG.1

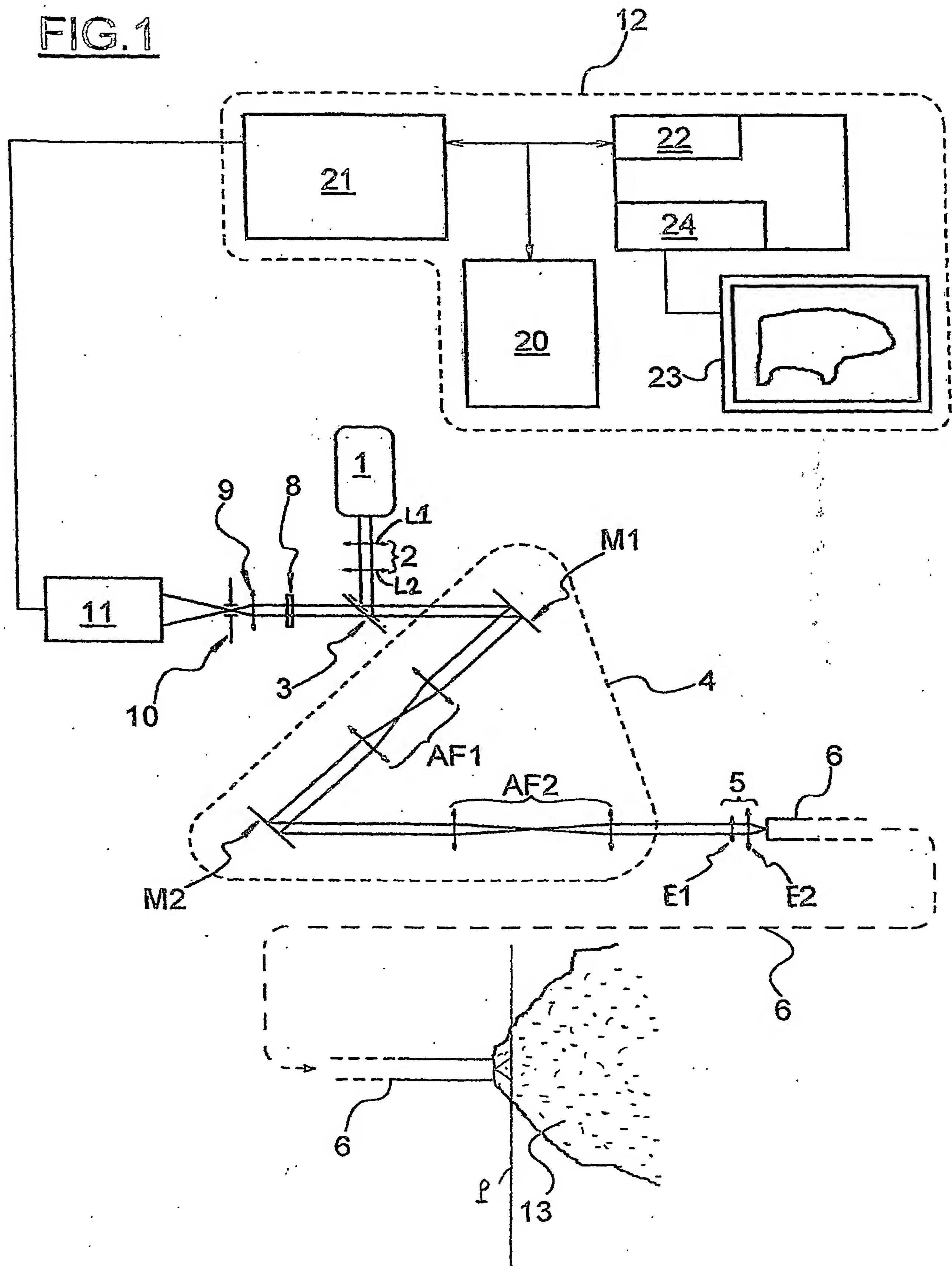
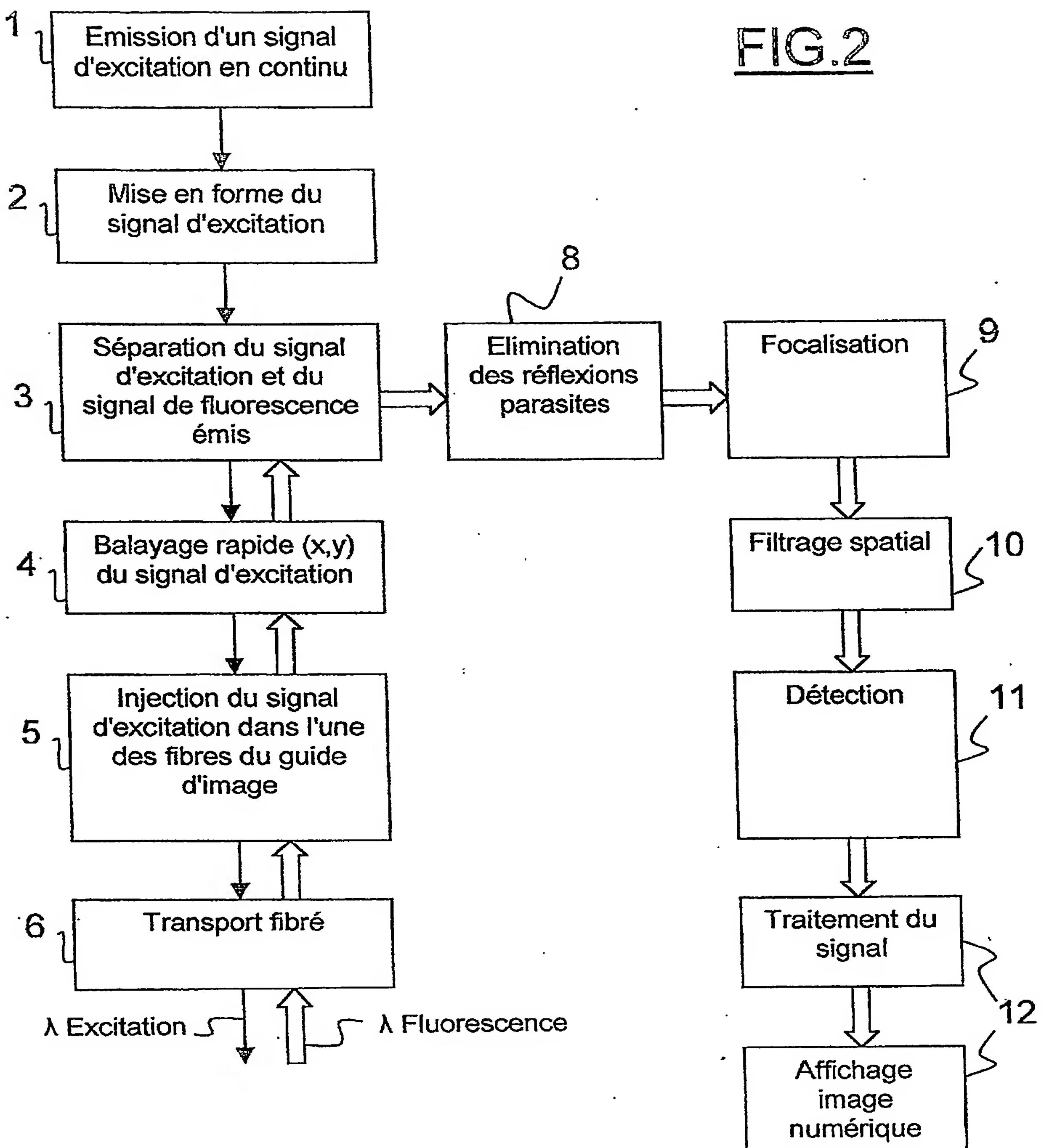


FIG. 2



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270501



<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		IFB03MKT CV2
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0302972
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
<p>MAUNA KEA TECHNOLOGIES Société par actions simplifiée 9, rue d'Enghien F-75010 PARIS FRANCE</p>		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1 Nom</b>		GENET
Prénoms		Magalie
Adresse	Rue	2, square Anne Franck
	Code postal et ville	17 181810 GUYANCOURT
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2 Nom</b>		VIELLEROBE
Prénoms		Bertrand
Adresse	Rue	8, rue d'Estienne d'Orves
	Code postal et ville	19 141310 VINCENNES
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3 Nom</b>		BERIER
Prénoms		Frédéric
Adresse	Rue	66, rue de Strasbourg
	Code postal et ville	19 121410 COURBEVOIE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>		
Orsay, le 10 Mars 2003		
Isabelle de SAINT VIANCE (CPI 94 10 01)		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

certificat  
N° 11235-03



**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IFB03 MKT CV2
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0302071
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence fibrée haute résolution	

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

MAUNA KEA TECHNOLOGIES  
Société par actions simplifiée  
9, rue d'Enghien  
F-75010 PARIS  
FRANCE

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

1 Nom	CLADE
Prénoms	Sophie
Adresse	Rue
	14, rue Perrichont
	Code postal et ville
	75016 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)	
2 Nom	
Prénoms	
Adresse	Rue
	Code postal et ville
	_____
Société d'appartenance (facultatif)	
3 Nom	
Prénoms	
Adresse	Rue
	Code postal et ville
	_____
Société d'appartenance (facultatif)	

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)  
DU (DES) DEMANDEUR(S)  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)**

Orsay, le 10 Mars 2003

Isabelle de SAINT VIANCE (CPI 94 10 01)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**